

⑫ 公表特許公報(A)

平3-502455

⑬ 公表 平成3年(1991)6月6日

⑭ Int.Cl.⁸
C 07 K 15/14

識別記号

庁内整理番号

8619-4H
7236-4B
8717-4B

C 12 N

審査請求 未請求
予備審査請求 有
5/00
15/00

部門(区分) 3(2)

B
C※

(全 14 頁)

⑮ 発明の名称 A 4 アミロイドペプチドに対する抗体

⑯ 特 願 平1-503253

⑰ 出 願 昭63(1988)10月11日

⑱ 翻訳文提出日 平2(1990)4月9日

⑲ 国際出願 PCT/US88/03590

⑳ 国際公開番号 WO89/06242

㉑ 国際公開日 平1(1989)7月13日

優先権主張 ㉒ 1987年10月8日㉓ 米国(US)㉔ 105,751

⑳ 発 明 者 マジヨチャ、ロン

アメリカ合衆国01778 マサチューセッツ、ウエイランド、イー・
ブレイン・ストリート 29番㉕ 出 願 人 ザ・マククリーン・ホスピタル・
コーポレーションアメリカ合衆国02178 マサチューセッツ、ベルモント、ミル・ス
トリート 115番㉖ 出 願 人 ユニバーシティー・オブ・ロチ
エスターアメリカ合衆国14627 ニューヨーク、ロチエスター、アドミニス
トレーション・ビルディング 30番

㉗ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 下記ポリペプチド配列内のエピトープに特異性を有する抗体。

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-

Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-

Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Ser-Ala

2. 下記ポリペプチド配列内のエピトープに特異性を有する抗体。

Ala-Glu-Glu-Pro-Tyr-Glu-Glu-Ala-Thr-Glu-

Arg-Thr-Thr-Ser-Ile-Ala-Thr-Thr-Thr

3. 下記ポリペプチド配列内のエピトープに特異性を有する抗体。

Arg-His-Val-Phe-Asn-Met-Leu-Lys-Lys-Tyr-

Val-Arg-Ala-Glu-Gln-Lys-Asp

4. ポリクロナル抗体である、請求項1、2または3の抗体。

5. モノクロナル抗体である、請求項1、2または3の抗体。

6. 請求項1の抗体が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレク

ション、ロックビル、MDに寄託され、寄託番号HB 9542を有す

る10H3と名付けられたハイブリドーマから得られた抗体の特異

性特性を有するモノクロナル抗体。

7. 10H3と名付けられたハイブリドーマ、ATCC No. HB

9542から調製される、請求項6の抗体。

8. ハイブリドーマATCCHB 9542。

9. 検出可能に標識された形の、請求項1、2または3の抗体。

10. 該検出可能な標識が、放射標識、酵素標識、補助因子標識、化

学ルミネセンス標識、バイオルミネセンス標識、蛍光標識、常磁性

標識および金属標識からなる群から選ばれる、請求項9の抗体。

11. 高分子担体に結合している、請求項1、2または3の抗体。

12. 試料中のA 4-アミロイドの検定または検出用イムノアッセイ

において、該試料をA 4-アミロイドに対する抗体と接触させて、

免疫複合体が該抗体と該A 4-アミロイドの間に形成されているか

否か決定することによりなり、該抗体として請求項1、2または3

の抗体を用いることよりなる改良。

13. 組織をイメージング有効量の請求項9の検出可能な標識抗体と接触させること、および

標識を検出すること、それにより、組織試料中にA4-アミロイドの存在を確立することよりなる、組織中のA4-アミロイドの存在検出方法。

14. 組織試料が組織セクションである、請求項13の方法。

15. 検出がインビボでイメージングすることにより行なわれる、請求項14の方法。

また、もしあるとすれば、アミロイドが、わずかに実質悪化の最終段階を示すという二次的およびそれ以上の消極的役割に関してブラーク形成の能動プロセスに貢献していることも述べられていない。

最近、アミロイド原線維蛋白の部分構造の決定にいくらかの進展があった。グレイマー等(1984a)は、アミロイドを、AD脳の脳組織から精製した。即ち、4.2KDポリペプチドが分離され、独特の24アミノ酸配列(β -ポリペプチド、第1図)を有することが示された。次いで同様の配列のポリペプチドが、ダクン症候群鼠の脳血管アミロイドから分離された(グレイマー等、1984b)。即ち、一個のアミノ酸置換、11位のグルタミンの代りにグルタミン酸、によって2つのポリペプチドが識別された。同様の結果は、マスターズ等(1985a)により、別個に得られ、彼らは、AD脳皮質からアミロイドブラークコアを精製し、分析した。即ち、28アミノ酸配列のG1a抗体が得られた(A4配列、第1図)。A4配列は、グレイマー等(USP4,666,829)により明らかにされた β -ポ

A4アミロイドペプチドに対する抗体

発明の背景

本発明は、合衆国政府の資金を利用してなされた。合衆国は、本発明に対しここに世界的に使用料不要、払い込み済み、非独占実施権を設定する。

発明の分野

本発明は、アルツハイマー病(AD)患者の脳中に発見されたA4アミロイドペプチドに特異性をもつ抗体、および、その、特に、AD老人性ブラーク亜型の神経病理学の定義に、ならびにAD脳組織の細かく詳細なイメージングへの使用に関する。

背景技術の概説

アルツハイマー病患者のブラーク中にアミロイドが存在することは、60年以上前(ディブリー、1927)知られたが、老人の脳中にアミロイドが生成し、アルツハイマー病中にこのひも状物質の付着が増大する分子メカニズムは依然として知られていない。

リペプチドとは、11,27および28位の3つのアミノ酸が異なる。本報告の重要性は、A4がADの品質説明特徴であるアミロイドブラークコアから誘導されたことである。A4のアミノ酸配列は、血管アミロイドから誘導された β -ポリペプチドのそれと異なる(第1図参照)。

残基1から10(第1図)を含む合成 β -アミロイドポリペプチドに対するポリクロナル抗血清を用いて、神経炎ブラークアミロイドが、脳血管の同様の原線維外傷と抗原決定基を共有していることが認められた(ロング等、1985)。同じ抗血清は、神経原線維細胞内の線維原體(neurofibrillary tangles(NFTs))を検出できなかった。対照的に、A4ポリペプチドの残基1-11に対して作られた抗血清は、血管ブラークまたは神経炎ブラークを検出できなかったが、むしろNFTに排他的特異性を発揮し、残基11-23に広がるA4ペプチドに対する抗血清は、ブラークと血管を染めた(マスター等1985b)。かくして、 β -ペプチドおよびA4ペプチドに対する抗体は、その特異性によって固定できないということが信

じられる前例をなす。

グレナー等U.S.P.4,666,829は、 β -アミロイドポリペプチドの最初の10アミノ酸(第1図)を用いる抗体製造を明らかにした。

本発明の要約

老人のAD痴呆の脳中の神経蛋白質蓄積に関する分子メカニズムの研究を促進し、AD亜型の鑑別のため改善された神経病理学目的を提供するため、我々は、既知の28アミノ酸A4配列(マスターズ等1985a,第1図)に対する抗体、ポリクロナルおよびモノクロナル(Mabs)の両方、を開製した。Mabsは、AD皮質および海馬部分にごく一般に特徴づけられ、アルツハイマー型アミロイドの個々のエピトープ部位の分析を行なうのに有用であることが示された。

3つのMabsは、特異的に広く特徴づけられ、下記の情報に当然のように得られている。(a)個々の標的エピトープにより明らかにされたブランクアミロイドの詳細な形態学的特徴(b)AD脳中のア

において抗原として用いた合成アミロイドA4ペプチド(マスターズ等,1985a)およびグレナー等により明らかにされたポリペプチド(U.S.特許4,666,829(1987))のアミノ酸配列を示す。A4ポリペプチドと他の2つのポリペプチドとの違いは、アンダーラインを引くことにより(アミノ酸11,27および28)描く。

好ましい実施態様の記載

本発明の抗体は、第1図に示されるA4 28個ペプチド上に存在する1またはそれ以上のエピトープに特異性を有する。本発明の抗体は、それらが免疫源としてA4 28個ポリペプチドで作られるのであればポリクロナルまたはモノクロナルであり得る。これらの型の抗体は、共に、以下に記載する多くの説明において用いられる。

本発明において用いられる用語「エピトープ」は、抗体分子との特異的相互反応に関係するいかなる決定基をも含む意味である。エピトープ決定基は、通常、分子、例えばアミノ酸または糖鎖の化学

ミロイド蓄積の新しい亜型の同定。(c)エピトープの蓄積に対する

ブランク成熟の関係。後者の研究は、コンピュータ補助イメージングおよび微量密度測定により可能となった。

抗体は、AD-アミロイド用インビボイムノアッセイ手法に用いることができる。それらは、また、AD-アミロイドの証拠としてノイロンのイメージング(例えば細胞化学的またはインビボ)に用いることができる。イムノアッセイおよび/またはイメージングのため、抗体は、たとえば放射、酵素または蛍光標識で検出可能に標識を付することができる。それらは、また、不溶性担体に固定させることができる。

A4 28個ペプチドに対し開製されたMabsの寄るしい局面は、それらがAD脳中でこれまで記述されていなかったアミロイド形成を明らかにすることである。従ってこれらのMabsは、Mabsの特異的な分類を示す。

図面の簡単な説明

第1図は、 β -ポリクロナル(グレナー等,1984a,b)、本発明

的に活性表面化学基よりなり、特異的電荷特質と同様、特異的三次元構造特質を有する。

ポリクロナル抗体は、適当な動物、例えばマウス、ウサギまたはヤギ等中に作るすることができる。A4-アミロイド28-ペプチドは、それ自体を注射し、または適当な免疫活性を有する担体、例えばKLHに結合することができる。免疫プロトコルのさらに詳細な記載は、実施例中に見ることができる。

モノクロナル抗体は、本分野の当業者によりよく理解され、ここにくり返さない手段を用いる種々の方法で製造することができる。これらの手段の詳細は、ロジャー・エッチ・グネット等により編集され、プレナム プレスにより出版された、モノクロナル アンチボディーズ-ハイブリドーマスラア ニュー ディメンション イン バイオロジカル アナリシス(1980)のような本に記載されている。

例えば、本発明において特異的に明らかにされたこれらに対する付加的ハイブリドーマ、これらはA4アミロイドの同定を可能にする

るモノクロナル抗体を製造する、は、容易に製造し、且つ最小スクリーニングで分離することができる。

A4 28個ペプチドに発見され、エピトープに特異的なモノクロナル抗体を製造するハイブリドーマは、まず、ハイブリドーマが製造されうような動物、例えばBalb/cマウスに、フロインドアジュバント中の28個ペプチドの皮下注射で免疫し、次いで数日以内にブースター注射することにより最も有利に製造される。溶解は、この分野の当業者が普通知っているどのような手段を用いても実施しうる。ハイブリドーマが28個ペプチドに特異的なモノクロナル抗体を製造していることを同定するためのハイブリドーマのスクリーニングは、まわりくどくなく、標準ELISAまたはRIAフォーマットのいずれかでなしうる。例えば、RIAスクリーニングフォーマットで、モノクロナル抗体を製造しているハイブリドーマからの培養上清または腹水を¹²⁵I-28個ペプチドと反応させる。

本発明の抗体は、液体または半液体ヒト試料を含めて、A4-アミロイドポリペプチドの同定用イムノアッセイに用いることができる。

これらの当分野で普通の技術は、抗体結合のための他の適当な標識として知られ、またはそのようなごく普通の実験を用いて確かめることができる。さらに、抗体にこれらの標識を結合するには、この分野での当業者に通常知られている標準的手段を用いて実施することができる。

抗体は、酵素に結合させうる。この酵素は、順に、基質にもっと後にさらされた場合、化学部分を製造するような手順で基質に反応させ、化学部分は、例えば分光光度または蛍光手段により検出する。検出可能な標識に用いる酵素の例としては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、スタフィロコッカスマクレーゼ、デルター5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ-グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペクターガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、ウタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼである。

イムノアッセイは、抗体-抗原免疫複合体の形成によるものであれば、競合またはサンドイッチが可能である。これらのアッセイは、この分野の当業者によく知られているので、ここでこれ以上詳細には記載しない。

アッセイの目的のため、抗体は固定化または標識化しうる。

抗体を固定のために結合することができ、本発明に使用しうる多くの担体が存在する、よく知られた担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁鉄鉱が含まれる。これら当分野でよく用いられるものとしては、抗体結合用の多くの他の適切な担体が知られ、またはそのようなごく普通の実験を用いて確かめることができる。

本発明の特別の実施態様において、1またはそれ以上の抗体を、検出可能な標識、例えば酵素、放射活性、アイソトープ、蛍光化合物、化学ルミネッセンス化合物またはバイオルミネッセンス化合物と結合しうる。

抗体の存在は、また、放射活性アイソトープでそれを標識することにより検出できる。放射活性アイソトープの存在は、次いでガンマカウンターまたはシンチレーションカウンターを用いるような手段により検出しうる。特に有用なアイソトープは、³H、¹²⁵I、³²P、¹²⁵P、¹⁴C、⁵¹Cr、⁵⁹Co、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁷⁵Se、および¹⁸⁷Reである。

蛍光化合物で標識化することにより抗体の存在を検出することも可能である。蛍光で標識された抗体は、適当な波長の光にさらされると、その存在が染料の蛍光にもとづき検出されうる。最も重要なフルオレセイン標識化合物の中には、フルオレセインイソチオシアナート、ロータミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロファイコシアニン、o-フタルデヒドおよびフルオレサミンがある。

抗体が検出可能に標識されうる他の方法としては、これを化学ルミネッセンス化合物と結合することによるものがある。化学ルミネッセンス化合物-結合抗体は、次いで化学反応工程の間に起こるルミネッセンスの存在を検出することにより同定される。特に有用な化学ル

特表平3-502455 (5)

ミネセンス標識化合物の例には、ルミノール、イソルミノール、芳香族-アクリジンエステル、イミダゾール、アクリジン塩およびシラ酸エステルがある。

同様に、バイオルミネセンス化合物もまた、抗体を標識するのに用いられる。バイオルミネセンスは、化学ルミネセンスの特別の形で、生物学的系統において見出され、そこで触媒蛋白質は、化学ルミネセンス反応の効率を増加する。バイオルミネセンス結合相手の存在は、ルミネセンスの存在を検出することにより同定される。標識を目的とする重要なバイオルミネセンス化合物として、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびアエコリン(aequorin)がある。

本発明のアッセイに用いられる抗体は、キットの調製に理想的に適している。かかるキットは、厳密にとにこめられた中に受入れを区別している担体手段、1またはそれ以上の容器手段、例えばバイアル、管などよりなり、該容器手段は各々、この方法で用いられるべき各成分の一つを含んでいる。

例えば、一つの容器手段は、不溶または部分的に可溶な担体と結

あることを意味する。

一般に、診断用の検出可能な標識抗体は、事例、例えば、患者の、年齢、状態、性および病気の程度、反対標示、もしあれば個々の生体によって調整されるべき他の変りやすい性質により変化する。用量は、0.01mg/kgから2.000mg/kgまで、好ましくは、0.1mg/kg-1.000mg/kgに変りうる。

用語「診断標識」とは、イムノグロブリンが診断検出可能な標識を結びつけることを意味する。

多くの異なるイメージング標識および標識方法は、この分野の当業者が既に知っている。本発明で用いうる標識の形の例としては、放射活性アイソトープおよび常磁性アイソトープが含まれる。

診断インビロイメージング用には、入手しうる検出機器の形として、与えられた放射核種の検出における大きな因子がある。選ばれた放射核種は、与えられた形の機器用に検出可能な環境の型を持たねばならない。一般に、診断イメージングを視覚化するいかなる普通の方法も、本発明に従って用いうる。

含する第一の抗体を含む。第二容器は、可溶で検出可能な標識第二抗体を、凍結乾燥の形でまたは溶液で含む。容器手段は、また、検出可能な標識第三抗体を、凍結乾燥の形で、または溶液で含んでいる第三容器を含んでもよい。かかるキットは、サンドイッチアッセイ用に用いることができる。例えばグビド等、USP4,378,110参照。これを引用して明細書記載の一部とする。

加えて、担体手段は、また、各容器が異なる、予め定められた量の既知A4-アミロイド抗原を含む多数の容器を含んでもよい。これら後者の容器は、次いで標準曲線を作成するのに用いることができ、そこに、未知量のA4-アミロイド抗原を含む試料から得られる結果を補正することができる。

イメージングは、インビトロまたはインビボで実施しうる。インビトロイメージングは、既に説明した標識で行なうことができる。インビロイメージングは、診断に有効な標識抗体で行なわれる。用語「診断に有効な」は、検出可能な標識抗体の投与量が、バックグラウンド信号と比べたときアミロイド存在の部位を検出するのに充分で

インビボ診断用の放射核種を選択するのに他の重要な因子としては、放射核種の半減期が十分に長くて、標的による最大取込み時間でもなお検出可能であるが、ホストへの有害な放射は最小であるように短かいことである。理想的には、インビロイメージングに用いられる放射核種は、粒状放射はないが、普通のガンマカメラにより直ちに検出される、140-200KeV範囲で多数の光子をするものである。

インビボ診断用には、核種は、中間官能基を用いることにより、直接または間接のいずれかで、抗体に結合する。抗体に対する金属イオンとして存在する放射アイソトープ結合するのにしばしば用いられる中間官能基は、アミンペンタ酢酸(DTPA)およびエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)である。イムノグロブリンと結合しうる金属イオンの典型例は、 ^{99m}Tc 、 ^{125}I 、 ^{111}In 、 ^{187}Re 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{125}I 、 ^{67}Ga 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Ac 、および ^{213}Bi である。

本発明の方法で用いられる抗体も、また、インビボ診断の目的に常磁性アイソトープで標識しうる。この方式で特に有用な成分(磁気共鳴イメージング(MRI)手法として)は、 ^{13}C 、 ^{31}P 、 ^{15}N 、 ^{19}F 、 ^{31}P 、 ^{13}C および ^{15}N を含む。

非経口投与用イメージング抗体の調製には、無菌水性または非水性溶液、懸濁液およびエマルジョンを含む。非水性溶媒の例は、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油および注射可能な有機エステル例えばオレイン酸エチルなどである。水性担体は、水、アルコール性/水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含み、それらは生理的食塩水および緩衝媒体、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳化化リンガー液または不揮発性油を含有する非経口伝播体を含む。静脈内伝播体は、溶液および栄養補液、電解質補液、例えばリンガーデキストロースなどをベースとしたものを含む。防腐剤および他の添加剤例えば、殺菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスなども存在してよい。一般に、レミント

5%トリフロロ酢酸/水を5分間、次いで5-100%直線勾配の0.05%TFA/ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 7分間で行なった。230nmでの光学密度プロファイルで、単一の大きなピークが現れ、これをさらに分析した。アミノ酸分析は、1%フェノール含有6MHC ℓ 中、18時間110℃で行なった。試料は N_2 下に乾燥し、クエン酸緩衝液に溶かし、LKB4151アルファプラスアミノ酸アナライザーで分析した。アミノ酸分析は、発表された配列と一致し、95-98%の近似収量を示した。ペプチド試料は、使用するまで乾燥粉末として-20℃で貯蔵した。いくつかの実験用に、ペプチドは、使用の前にケホールリンベットヘモシアミン(バブコ、パークレイ、カリフォルニア)と結合した。

ポリクロナル抗体(PAb)の調製

ニュージーランド白雌ウサギを、合成アミロイドペプチドに対するポリクロナル抗体の製造用に用いた。ある場合、KLHに結合したAPを抗原として用いた。皮下注射は、フロイント完全アジュバント中に乳化した1mgのAPを用いて行なった。3週間後、動物が

ンズ ファーマシューティカルサイエンス、16版、Mac Ede, 1980参照。

実施例

材料および方法

全ホルマリン固定、剖検図は、マクレーン ホスピタル プレイン ティシュー リソース センターから入手された。前頭葉前方皮質(PC)または海馬セクションを用いた。

合成アミロイドポリペプチドの製造および特性

28残基のA4アミロイドポリペプチド(第1図)、これはマスターズ等(1985a)の既に報告された配列に相当する、は、メリフィールド(1963)の一般的手法を用いてバイオサチSAM2シンセサイザーで合成された。精製は、セファデックスG50(10-40 μ)の3 \times 65cmカラムで実施した。一部をとり、TLCプレートにスポットし、フルオレサミンを噴霧して蛋白を定着させた。材料を集めて、分析用HPLCカラム(ビデックC $_{18}$ 、カタログNo. 218TP54)に詰めた。溶出は、1.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で、0.0

ら採血し、反応性を試験した。動物は、3週間後、フロイント不完全アジュバント中1mgのAPを用いて再び注射した。2週間後、血清を試験し、1/1,000希釈でプラスの反応を示すことが観察された。次いでウサギは、2ヶ月間1mgAPを注射し、その後血清は、免疫プロットによりアッセイすると、1/1,000よりも大の希釈で陽性であった。

モノクロナル抗体(MAb)の調製

Balb/cマウスを、フロイント完全アジュバント中各1mgのAPで皮下注射した。3週間後、血清は、記載したアッセイを用いて1/1,000の希釈で陽性であった。溶解の5および4日前に、100 μg のAPをリン酸緩衝生理食塩水中で皮下および腹腔内注射した。脾臓細胞を分離し、形質細胞腫瘍P3NS1/1-4AG-1細胞(ガルフレ等1977)と融合した。上清の抗体活性を10-14日後、下記のアッセイ手段を用いて試験した。陽性コロニーを限界希釈によりサブクローンし、次の実験に用いた。10H3と名付けられる一つのハイブリドーマは、本出願の出願日前に、アメリ

特表平3-502455 (7)

カン タイプ カルチャー コレクション、ロックビル、メリーランドに、ブタベスト条約の条文下で寄託され、寄託番号HB9542が与えられた。

ドットプロットアッセイ

抗体のAPに対する反応性を、製造者の手引きに従ってバイオラド ドット プロット装置を用いて試験した。最初のスクリーニング用に、1 μ gのAPを、0.5 μ lの水に1%ドデシル硫酸ナトリウム中で音波処理し、同量の、2.5%トリメントール100、0.3M NaCl、4.0mMトリスHCl、pH7.4に加えた。1 μ gAPを各ウエルに加え、次いで50 μ lの10%BSAを加えた。Mabアッセイ用に、150 μ lの培養上清を各ウエルに加えた。Pabアッセイは、150 μ lの0.15M塩化ナトリウム、20mMトリス含有緩衝生理食塩水(TBS)pH7.4中に、1/500、1/1,000および1/10,000に希釈した血清を用いた。濾過後、TBSは、抗体添加と基質添加前との間の中間洗浄に用いた。50 μ lの、西洋ワサビペルオキシダーゼ接合親和性の精製ヤギ抗マウスまたは

抗ウサギIgC(キャップa)、5%BSA、0.5%トリス×100、0.15MNaCl、20mMトリス塩酸、pH7.4中に1/2、000希釈を各ウエルに加えた。反応生成物を、ジアミノベンチジン0.5 μ g/ μ l、イミダゾール1 μ g/ μ lおよびH₂O、0.015%を用いて視覚化した。ネガティブコントロールは、組織培養媒体または前免疫血清、APの省略およびAP以外の蛋白に特異的なモノクロナル抗体上清の添加より構成した。続くアッセイ用に、ウエル当りの抗体量を、0.001-1 μ gの範囲にわたって変化させ、抗体を異なる希釈で試験した。このアッセイで、種々の量の抗体を含むニトロセルロースの各ストリップを、ブラウン等(1983)により記載されたように免疫染色した。

PAGE手法

PAGE手法は、既に記載された(ブラウン等、1981、1982)ように実施された。発表された手法からの変更は明細書中に記載した。

イムノプロットアッセイ

10%グリセリンおよび50mMトリスHClを含む溶液、pH8.5を用いてカバーグラスした。明細書に示したものは、二重染色を同一組織に実施した。デオフラビンSで染色したセクションは、次いで上記した免疫細胞化学手法の方法により染色した。

コンピューター補助イメージ増加

アミロイド蛋白用に免疫染色した前頭葉前方皮質の検体を、コンピューターと界面したMC185テレビデオカメラをそなえたライツ ラボラックス12光学顕微鏡で視覚化した。免疫染色したアミロイド沈着物の伝達されたイメージは、疑似色吸光度コードづけをそなえたソフトウェアを用いるコンピューターにより処理した。伝達されたイメージは、イメージ中の各レベルの灰色に特定されたそれぞれの色に従って分離モニターに再構成された。かくして、アミロイド沈着物内の内部密度変化を評価し得た。

結果

ペプチド調製および特性表示

計算分子量3.2KDの、28アミノ酸の合成アミロイドペプチ

ニトロセルロースへの蛋白の電気泳動転移および免疫染色手法は、既に記載された(ブラウン等、1983)ようにして実施した。

免疫組織学

ホルマリン固定ヒト側脳組織は振動分節(ビプロトーム)で50 μ mに切断した。全セクションの材料は染色前に10分間1%H₂O₂中にインキュベーションすることにより前処理した。反応は、水中にセクションを置くことにより7分後に停止した。組織をゼラチン塗布ガラスライド上にのせ、空気乾燥しそしてパーマウント(フイッシャー)を用いてカバーグラスした。免疫血清を1/1,000希釈で、免疫前血清は1/200の希釈で適用し、Mab培養上清は希釈しなかった。

デオフラビンS染色

ホルマリン固定セクションを、0.1%のデオフラビンS(シグマ)のTBS溶液中に10分間置いた。過剰の染料は、組織セクションを70%エタノール中に1-2分間、次いで水中に置くことにより除去した。セクションを、20%ポリビニルアルコール(シグマ)、

特表平3-502455 (8)

ド(AP)(第1図)を合成し、次いで免疫学的研究の前にPAGE手法により分析した。APを、2% SDS、5%メルカプトエタノールおよび9.5 M尿素含有PAGE試料緩衝液に溶解し、0.1% SDS含有10%ゲル上で電気泳動した。クーマシーブルー染色後、ペプチドは約23-25 KDで広いバンドおよび細いバンドとして現れ、細いバンドは電気泳動中にゲルフロントに移動した。より高分子量の種が集合体として現れたがそれは分離ゲルに尿素を加えることにより除去された。APは、9.5 M尿素含有試料緩衝液に溶解し、6%尿素および2% SDSを含有する10%または15%ゲル上で電気泳動した。クーマシーブルーで染色後、主な種が3-4 KDバンドとして現れ、それは変性ポリペプチドの固りよりなる。かくして、合成APは、集合ポリペプチドを有し、天然に生成する4 KDのアミロイド蛋白(マスターズ等、1985b)に似ていない。続く実験で、APに対する抗体は、集合および変性形の両方に関して特性をみた。

ポリクロナル抗体(Pabs)の特性表示

モノクロナル抗体(Mabs)の特性表示

24ハイブリドーマの上清は、ドットプロットアッセイにより示されたようにAPに陽性であった。その、特に強い結合性質を有する3つのMabsは、さらに特性を調べた。ドットプロットは、4E12、5E2および10H3と名付けられた3つのMabsが、少くともポリクロナル抗血清と同程度に反応性であることを示した。いくつかの免疫細胞化学実験において(下記参照)、両者の3つのMabs混合物を用いた。というのは混合調製物も、また、合成ペプチドに対し強力に反応性であったからである。ポリクロナル血清とは、各Mabsは、電気泳動前に、前もってSDSで置換したAPと強く反応した。

ポリクロナル抗血清によるアミロイドの免疫検定

最初の免疫染色研究は、APに対するポリクロナル抗血清を用い、得られたデータは、Mabsを用いる後の実験と比較のためベースとした。AD症例の前駆症候前方皮質(PC)は大量のブラックとインターノイロンNFTsを含み、それらはチオフラビンSによる染色に

血清を、APに対して免疫したウサギから集め、種々のイムノアッセイ手法により試験した。迅速ドットブラットスクリーニング手法を用いて、非接合ポリペプチドに調製された抗血清スカーレット-1が0.01 μgレベルで反応し、上記背景で0.001 μgの抗原により染色を生成した。この抗体レベルで、免疫前血清からの反応生成物は、わずかに視覚できた。スカーレット-1を、APのKLH-結合誘導体で免疫したウサギからの血清よりもより強力にした。

スカーレット-1は、APの集合状態に関し特性を明らかにした。ドットプロットアッセイは、第一にポリペプチドの集合複合体を含有するが、この可能性がさらにページにより試験された。APを2% SDS含有ゲルで集合体を形成する条件下に電気泳動した。電気的プロットを同じゲルから調製し、スカーレット-1で免疫染色した。抗血清は集合種だけでなく低分子量種を検出した。かくして、アミロイドポリペプチドに対応して生成された抗血清は、AP集合状態全く関係がなかった。

より容易に視覚化された(ケルニイ、1967)。同一組織をスカーレット-1で免疫染色すると鮮やかにアミロイドブラックが現れ、それは、PCおよび4つのAD症例の海馬中に見られた典型例であった。

同じ結果は、免疫前にKLHと結合した、合成アミロイドポリペプチドに対して調製した抗血清で得られた。スカーレット-1の免疫前血清はAD脳組織を染色できず、免疫血清は、正常コントロール中、たまたま神経炎ブラックを検出し得た。

スカーレット-1抗血清は、AD脳の血管系に強く結合した。チオフラビンSで、および免疫血清で染色される管の縦断断面は、抗AP血清が蛍光染料で視覚しうる最も強い染色特徴を検出することが示された。さらに免疫染色により、脳組織中、アミロイド材料と血管アミロイドとの強い結合が明らかになった。断面に切られた血管適用された二重標識手法により、チオフラビンSと結合する全ての血管層はスカーレット-1免疫血清で検出できることが確認された。

特表平3-502455 (9)

モノクロナル抗体は、AD脳アミロイドから誘導されたA428
アミノ酸ポリペプチドに調製された(マスターズ等, 1985a, 第1
図)。24ハイブリドーマの上清は陽性で、この、特に強い結合性
質を有する3つのMabsをさらに特徴づけた。ドットプロットは、
4E12, 5E2および10H3と名づけられる3つのMabsがきわ
めて高希釈でさえポリペプチドに対し強く反応性であることを示し
た。いくつかの免疫細胞化学実験で(下記参照)、3つのMabsの同
量混合物を用いた。

最初の研究は、アビジン-ビオチン 西洋ワサビペルオキシダー
ゼ手法を用いるAD脳セクションの免疫染色および通常のイメージ
ング方法によるエピトープ分布の分析によって、Mabsの特異性を
確立することを目的とした。前頭葉前方皮質を用いた。チオフラビ
ンSで染色したセクション、それは脳アミロイドと反応することが
知られている、は、Mab5E2で逆染色した。抗体は、蛍光染料
と重複する分布でアミロイド沈着物と結合した。他の研究では、3
つのMabsで染色されたおびただしいブラークを顕微鏡して、これら

のコンピューター増強イメージング方法を用いるより詳細な研究の
ための選択方法であることが明らかになった。

予期されたように、Mabsは、アミロイドの真実沈積と反応し、
また血管のアミロイドを検出し、二重染色実験(チオフラビンおよ
びMab)により指示した。

免疫染色様式の視覚化を改良し、種々のアミロイド構造中のエピ
トープ分布についての詳細な情報をさらに集めるために、我々は、
コンピューター増強イメージング手段を用い、これは、立体構造の
分析を増強させた。

の抗体が、AD脳アミロイド沈着物についてのこれまでの報告より
ももっと多くの詳細な構造情報を提供したことを示した。Mabsは、
標的エピトープが異なる大きさおよび異なる形態の沈積をおこすこ
とを示した。例えば、10H3エピトープはコア内および末梢環状
構造(リング)に局在したにもかかわらず、他の例では、同じエピト
ープがもっとまばらに分布した。これらの研究経緯の間の、リン
グにより囲まれるアミロイドコアの免疫検定は、独自の発見で、他
の形態を次に示す。

考慮中の3つのMabsがA428脳アミロイドポリペプチド配列
の同一または異なるエピトープ部位に特異的かどうかは知られてい
ないが、共に混合すると、それらは、組織の特に強い染色を与え、
けれども暗反応生成物が低背景染色と鮮かに対立している。コント
ロール研究で、神経病理学的に正常なコントロールに適用したMab
混合物では明るい背景染色以上には染色しなかった。混合Mabに
よるアミロイドの特異的で強い染色は、老人性ブラークの他の成分
からインターフェイスすることなくエピトープ分布を分析するため

Mab混合物で免疫染色した前頭葉前方皮質のセクションは、透過イ
メージを作るためのコンピューターとインターフェイスしたテレビ
ビデオカメラを駆使した光学顕微鏡の手段によって観られる。イメー
ジを数字に表わし、大きさ評価をし、そして疑似カラーグレイ目盛
を用いて異なるレベルの密度を表示した。主要な型のアミロイド沈
着物が大きさ、内部体積および内部密度の点から明らかにされた。

4つのクラスの異なる大きさのアミロイド沈着物が同定された、
小さい点状アミロイド沈着物($9.06 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 直径)は、最も
普通に観察される免疫染色立体構造であった。点状沈着物にしばし
ば近接して見られたのは、極少量の物質で、それは前駆体を表すか
も知れない。斑点状アミロイド沈着物($30.87 \pm 1.28 \mu\text{m}$ 直
径)と言われるアミロイド蓄積は、それらがより大きな直径のもの
と区別されるので、全体として1つのクラスとして考えられた。一
例では、多重フォーカスの密集沈着物が、場の至るところに存在し
た。即ち類似の大きさの第二の斑点構造は、わずかに拡散反応生成
物を含有了。他の例は、アミロイドの暗い染色蓄積として現れた。

また、リング状アミロイド沈着物(40.51±4.65μm直径)で観察され、その中の中央部分はアミロイドを僅かに含むか全く含まなかった。最もまれな立体構造は、リング+コアアミロイド沈着物(明確で別のアミロイドコアを含むリングのアミロイド、リングは48.73±7.36μm直径を示し、コアは12.85±2.20μm直径を示した)であった。合成ポリペプチドに対する、ポリクロナル血清によるアミロイド沈着物のこれまでの免疫染色では、リングまたはコアを伴うリングパターン検出されなかった(マズターズ等、1985b; ロング等、1985)。

新生皮膚に関して、点状沈着物は、主に層Ⅰに局在し、それらの出現の割合は、皮膚外膜内のそれらの深さと逆に関係した。対症的に、斑点状沈着物は、異なる分布をもった。点状沈着物と比べると、斑点状タイプは、層Ⅰにはより少ない範囲で現れたが、層Ⅱからではより多い程度で現れた。リング形は、全ての層に現れた。コアを伴うリング構造は、他の形態よりも少ない頻度で出現した。この異

なされるべきことである。この免疫特異性に基づき、観察は、アミロイドに加えて、種々の細胞および細胞成分を含む(ウイスニュースキーおよびテリー、1973)単一ブランクのものに関してはなされず、代って、我々の試みは、アミロイドに対し高特異性をもつMabsにより同定しうる形態学的物質に焦点を合わせた。他の研究で、我々は、ビールコウスキー染色が、層ⅡおよびⅢは、最も多数の老人性ブランクを含むが、一方類似の組織セクション中の層Ⅰまたは他層の点状外傷が見られないことを示すことを観察した。この理由のために、免疫検出可能なアミロイド沈着物と以前に明らかにされた老人性ブランクとの間にわずかに一部重複するところがあるということを強調することは重要である。

斑点状アミロイド沈着物は老人性ブランク内アミロイドの以前の記載(ウイスニュースキーおよびテリー、1973)に相当するのかも知れないが、我々が記載した該形態は独特であることが明らかである。特にA4-28個ポリペプチドに対するMabsは、既に記載されているもの示されていないAb脳中の一連のアミロイド沈着物

なるアミロイドクラスの層分布は、これまで記載されていない。

免疫ペルカシシダーゼ染色アミロイドは、コンピューター増強イメージング方法によるパターン分析を可能とし、これは、その密度分布に従って種々のエピトープ部位を視覚化した。この研究を用いて、我々は、AD脳中のアミロイドについてこれまで認められてきたよりも、より大きな程度の不均質さを観察した。点状沈着物は、その小さな直径にもかかわらず、反応生成物密度の内部勾配に関係なく見られた。全ての形態学的タイプは、類似のアミロイド免疫反応性成分を示した。これらの反応生成物の成分は、ペルカシシダーゼ段階の間、溶解に関係しなかった。というのは、短時間(3-4分)および長時間(7-8分)のいずれのインキュベーションも類似の大きさおよび内部不均質性の沈着物を示したからである。4つのグループのアミロイド沈着物間の全ての形態学的変化と関係なく、通常の特徴は、高密度の多重フォーカスが存在することである。

本研究で用いたMabsがアミロイドに高い特異性を示し、組織染色法により検出する単一ブランクに必ずしも示さないことは、強調

を視覚化した。即ち、点状の、それぞれ内部密度勾配を有するリングおよびリング+コアアミロイド沈着物は、独創的発見である。これらのMabsの独特の局面は、これらをADの亜型を詳しく研究するための強力な反応剤として使用することを示唆する。

上で論じた手法は、独特なMabsの製造によく適し、ADの分子生物学を実験するための新しい道具を提供する。それ故、我々は、抗体を調製するため2つの付加ペプチドを作るため同一方法を用いた。カンク等(1987)は、胎児脳から取ったA4アミロイドcDNAプレカーサーを報告した。配列は、2つのポリペプチド部分を示す。独特さは、バイオレットデータベースによる研究ののち、確認された。2つのペプチドは次の通りである。

I. Ala-Glu-Glu-Pro-Tyr-Glu-Glu-Ala-Thr-Glu-Arg-Thr-Thr-Ser-Ile-Ala-Thr-Thr-Thr
II. Arg-His-Val-Phe-Asn-Met-Leu-Lys-Lys-Tyr-Val-Arg-Ala-Glu-Gln-Iys-Asp

ペプチドは、合成され、精製された。マウスおよびウサギへの注入により、既にA4ペプチドに適用された手法を用いるポリクロナルおよびモノクロナル抗体を生成する。

引用文献

オールソップ、ディー等、ブレイン・リサーチ259巻348-352頁(1983)

ブラウン、ビー・エイ等、ジャーナル・オブ・ニューロケミストリ40巻299-308頁(1983)

ブラウン、ビー・エイ等、ジャーナル・オブ・ニューロケミストリ36巻143-153頁(1981)

ブラウン、ビー・エイ等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー94巻159-164頁(1982)

ディブリー、ビー、ジャーナル・オブ・ニューロロジー、ニューロサージェリー・アンド・サイキアトリイ27巻643-657頁(1982)

ガルフレ、ジー等、ネイチャー266巻550-552頁(197

マスターズ、シー・エル等、エムボ・ジャーナル4巻2757-2763頁(1985b)

メリフィールド、アール・ビー、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ85巻2149-2154頁(1963)

メルツ、ビー・エイ等、アクタ・ノイロパソロジカ(ベルリン)60巻113-124頁(1983年)

ウイスニユスキイ、エイチ・エム等、アナルズ・オブ・ザ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンス396巻119-129頁(1982)

ウイスニユスキイ、エイチ・エム等「リイグザミネーション・オブ・パソグネシス・オブ・ザ・セナイル・ブラーク」イン・エイチ・エム・チンマーマン(エディター)、プロクレス・イン・ニューロパソロジー1-26頁、グルー・アンド・ストラット・ニューヨーク(1973)

本発明を今十分に記載したことで、同じことが広く同等の程度のバ

7)

グレナー、ジー・ジー等、バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション120巻885-890頁(1984a)

グレナー、ジー・ジー等、バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション122巻1131-1135頁(1984b)

カング、ジェイ等、ネイチャー325巻733-736頁(1987)

ケレニイ、ジー、アクタ・ノイロパソロジカ7巻336-348頁(1967)

マロッタ、シー・エイ等、プログ・ブレイン・レス・インプレス82巻4245-4249頁(1985a)

マスターズ、シー・エル等、プロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユースエイ82巻4245-4249頁(1985a)

ラメーター、条件等のなかで、本発明またはそのいかなる実施態様の精神または範囲に影響を及ぼすことなく実施できることは、容易に明らかである。

1989年4月8日受理

微生物

微生物に関するその用紙は明細書13頁31行に引用した。

寄託機関の名称

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション

寄託機関の住所

アメリカ合衆国20852 メリーランド、ロックビル、

パークローン・ドライブ 12301番

寄託の日付

1987年11月18日

寄託番号

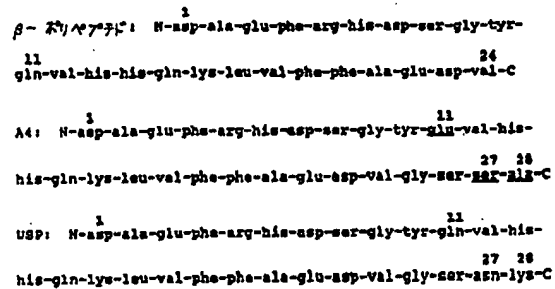
HB 9542

付加表示

マウス・ハイブリドーマ、10 H 3

ヨーロッパ特許が求められている指定国に関し、寄託された微生物の試料は、ヨーロッパ特許の付与の告示の公表まで、または出願が拒絶されまたは取り下げられもしくは取り下げられたとみなされる日まで試料を請求している者より指定された専門家にのみ試料が行われ、入手可能となる(EPC28条(4))

FIG.1

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の8)

平成2年4月9日

特許庁長官殿

1. 特許出願の表示

PCT/US88/08590

2. 発明の名称

A4アミロイドペプチドに対する抗体

3. 特許出願人

名称 ザ・マククリーン・ホスピタル・コーポレーション
(ほか1名)

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1281
氏名 井理士 (8214) 青山 薫

5. 補正書の提出年月日

1989年12月8日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文



1 通

請求の範囲

2. 下記ポリペプチド配列内のエピトープに特異性を有する抗体。

Ala-Glu-Glu-Pro-Tyr-Glu-Glu-Ala-Thr-Glu-

Arg-Thr-Thr-Ser-Ile-Ala-Thr-Thr-Thr

3. 下記ポリペプチド配列内のエピトープに特異性を有する抗体。

Arg-His-Val-Phe-Asn-Met-Leu-Lys-Lys-Tyr-

Val-Arg-Ala-Glu-Gln-Lys-Asp

4. ポリクロナル抗体である、請求項2または3の抗体。

5. モノクロナル抗体である、請求項2または3の抗体。

6. アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビル、

MDに寄託され、寄託番号HB9542を有する10H3と名付けられたハイブリドーマから得られた抗体の特異性特性を有するモノクロナル抗体。

7. 10H3と名付けられたハイブリドーマ、ATCCNo. HB

第1頁の続き

⑥Int. Cl. ¹		識別記号	庁内整理番号
A 61 K	49/00	C	9051-4C
	49/02	B	9051-4C
		C	9051-4C
C 12 N	5/20		
C 12 P	21/08		8214-4B
G 01 N	33/53	D	7906-2G
	33/577	B	9015-2G
// A 61 K	39/395	D	8829-4C
		N	8829-4C
C 07 K	7/08		8318-4H
	7/10		8318-4H
C 12 N	15/06	ZNA	
(C 12 P	21/08		
C 12 R	1:81)		
C 07 K	99:00		

⑦発明者 マロータ、チャールズ・エイ

アメリカ合衆国02140 マサチューセッツ、ケンブリッジ、ナンバー8、リッチデイル・アベニュー 1番

⑧発明者 ザイン、セイーダ

アメリカ合衆国14534 ニューヨーク、ビッツフォード、ノブヒル・ドライブ 5番

Japanese Patent Application, JP-HEI 03/502455.

Summary of the Invention

To promote study of the molecular mechanisms involved in the accumulation of fibrous protein in the brains of elderly persons with AD, and to achieve the goal of improved neurophysiologic differentiation of type I AD, we prepared both polyclonal and monoclonal (Mabs) antibodies to the known 28 amino acid A4 sequence (Masters et al., 1985a, Fig. 1). Mabs have been indicated as being useful for the analysis of various epitope sites of Alzheimer's amyloids generally characterized as being part of the AD cortex and hippocampus.

With three Mabs, broadly characterized in terms of specificity, the following information is being naturally obtained: (a) detailed morphological characteristics of plaque amyloids that have been elucidated by various target epitopes; (b) identification of new type I amyloid accumulation in AD brains; and (c) the relation of epitopes to plaque maturation in accumulation. Study of the latter has become possible by computer-assisted imaging and microdensity measurement.

The antibodies can be employed in *in vivo* immunoassaying for AD amyloids. They can be employed in neural imaging (cytochemical or *in vivo*, for example). The antibodies can be detectably labeled with radioactive, enzymatic, or fluorescent labels for immunoassaying and/or imaging. They can also be immobilized on insoluble carriers.